Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Research Article
Vol. 20, No. 2, May-June 2024, p. 267-279

Production of Gelatin-Pullulan- Nanofibers Cellulose Film Containing *Salmonella* Phages and Effect Its Anti-*salmonella* Against *Salmonella typhimurium*

A. Entezari[1], N. Sedaghat[2*], G. Shakeri[3]

1 and 2- Ph.D. Student and Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: sedaghat@um.ac.ir)
3- Fellowship Researcher, German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Department of Chemicals and Product Safety, Berlin, German

Received: 04.05.2023 Revised: 12.08.2023 Accepted: 16.08.2023 Available Online: 19.08.2023	**How to cite this article:** Entezari, A., Sedaghat, N., & Shakeri, G. (2024). Production of gelatin-pullulan-nanofibers cellulose film containing *salmonella* phages and effect its anti-*salmonella* against *Salmonella typhimurium*. *Iranian Food Science and Technology Research Journal 20*(2), 267-279. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.82253.1256

Introduction

The main sources of *Salmonella* for humans are pork, beef, chicken, eggs, fruits, vegetables, and their derivatives such as mayonnaise, and peanut butter. Different species of Salmonella can adapt, grow or survive at different environmental conditions. *Salmonella enterica* is a majorcause of food borne illness in humans, and *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* serovars are the most prevalent. One strategy is to use active packaging to reduce the microbial load or prevent the growth of microorganisms on food. Recently, antimicrobial active packaging has received much attention due to maintaining food quality, safety, and increasing shelf life. Among the antimicrobials used in the food industry, bacteriophages have a very good efficiency to control pathogenic bacteria. Pullulan has a good ability to form a film, its film has good characteristics such as transparency, odorlessness, tastelessness, solubility in water, and low permeability to oxygen and fat, However, the major obstacle is related to its price. The combination of polysaccharides with proteins has been done in order to improve the performance and reduce the costs of films. Gelatin is a suitable option to combine with pullulan in terms of good mechanical properties, reduced permeability, and its good price. Different ratios of gelatin and pullulan were studied and suitable film selected, but it needed to modify, so nanofibers cellulose was added in order to improve the mechanical properties and water resistance. Adding cellulose nano fiber can be a good and appropriate option. The aim of this research was to evaluate theantibacterial effectiveness of gelatin-pullulan-nanofibers cellulose composite film containing bacteriophage against *Salmonella typhimurium* at two different temperatures.

Materials and Methods

Gelatin and pullulan powders were weighted separately and mixed together (20gelatin-80pullulan). Nanofiber cellulose was extracted from rice bran and was used at three different levels (1%, 3%, and 5%). Commercial bacteriophage solution was added to each of the films separately and the films were prepared by molding method. Thickness, moisture content, solubility, swelling, tensile strength, and elongation of gelatin-pullulan film containing nanofibers were studied. Zone inhibitory of films containing different percentage of cellulose nanofibers on the agar media against *Salmonella typhimurium* (10^4 CFU.ml^{-1}) was evaluated. The, antibacterial effect of selected film on the poultry meat inoculated with *S. typhimurium* (10^4 CFU.g^{-1}) and several phages on the surface meat at 4 °C and 12 °C was also investigated.

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.82253.1256

Results and Discussion

The results indicated that gelatin-pullulan films containing different percentages of cellulose were showed approximately 2 mm of zone inhibitory compare to films free of phages. Also, inhibitory among films at different percentage of nanofiber cellulose did not show significant change. Antibacterial effect on poultry meat was dependent on temperature, films loaded with bacteriophages at higher temperature (12 ℃) was more effective compare to lower temperature (4 ℃). The populations of *S. typhimurium* were decreased 1 log and 0.7 log than control samples at 4 ℃ after 7 and 9 days respectively, while at 12 ℃, 1 log and around 2.55 log decrease was found after 1 and 9 days, respectively. In a study, beef inoculated with salmonella was treated by SALMONELEX^{TM} bacteriophage and resulted in 1.29 log reduction of pathogenic bacteria compared to the control sample (Yeh *et al.*, 2017). In another study, the antibacterial effect of double-layer poly lactic acid/xanthan film at 10 °C compared to 4 °C against pathogenic bacteria of Salmonella and Listeria was determined and found that at10 °C, the number of pathogenic bacteria was decreased more than at 4 °C (Radford *et al*., 2017).. Kamali *et al.* (2022b) reported that the release of phages from the film of 30 poly lactic acid/70 whey protein to the meat surface after one hour was 63.22 % and 63.18 % at 4 °C and 10 °C, respectively, which means no significant difference, after one day at both temperatures.

Keywords: Bio-control, Composite film, Food safety, Pathogen bacteria

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
https://ifstrj.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۲۰، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۳، ص. ۲۷۹-۲۶۷

تولید فیلم مرکب ژلاتین-پلولان-نانوالیاف سلولز حاوی فاژ *سالمونلا* و بررسی اثر *ضدسالمونلایی* آن علیه *سالمونلا تایفی موریوم*

اسما انتظاری[۱]- ناصر صداقت[۲*]- گلشن شاکری[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۵

چکیده

امروزه به‌دلیل وجود نگرانی‌های زیست‌محیطی و افزایش تقاضای مصرف‌کنندگان برای محصولات غذایی با کیفیت و ماندگاری بیشتر، استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های زیست تخریب‌پذیر مورد توجه بسیاری واقع شده‌اند. در این مطالعه، اثر افزودن در صدهای مختلف نانوالیاف سلولز به فیلم مرکب ژلاتین-پلولان و اثر ضدباکتریایی فیلم‌های حاوی باکتریوفاژ توسط روش انتشار دیسک بررسی شد. به‌علاوه، اثر ضدباکتریایی فیلم مرکب ژلاتین-پلولان-نانو فیبر سلولز روی گوشت مرغ در طول دوره نگه‌داری در دو دمای ۴ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد علیه باکتری *سالمونلا تایفی موریوم* مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش در صد نانوفیبرهای سلولز در فیلم ژلاتین-پلولان ضخامت، حلالیت، تورم، مقاومت کششی، و در صد کشش پذیری فیلم‌ها به‌ترتیب افزایش، کاهش، افزایش، افزایش، و کاهش یافتند. فیلم‌های حاوی باکتریوفاژ روی محیط آگار ناحیه بازدارندگی خوبی داشتند. استفاده از فیلم ضدباکتریایی روی سطح گوشت مرغ در دمای ۱۲ °C بعد از یک روز منجر به کاهش یک سیکل لگاریتمی شد در حالی‌که در دمای ۴ °C در روز هفتم یک سیکل لگاریتمی کاهش را در جمعیت باکتری *سالمونلا* منجر شد.

واژه‌های کلیدی: ایمنی غذا، بیوکنترل، پاتوژن، فیلم مرکب

مقدمه

منابع اصلی *سالمونلا* شامل گوشت خوک، گاو، مرغ، تخم مرغ، میوه‌جات، سبزیجات، و مشتقات به‌دست آمده از آن‌ها مانند مایونز، و کره بادام زمینی است. گونه‌های مختلف *سالمونلا* می‌توانند با شرایط مختلف محیطی سازگار شده، رشد کرده و یا زنده بمانند (Gouvea *et al.*, 2015). *سالمونلا انتریکا* به‌عنوان یک عامل مهم در از بین رفتن مواد غذایی، اقتصاد، و سلامت انسان تلقی می‌شود، که دو سرووار مهم آن *سالمونلا تایفی موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* بیشترین شیوع را در بیماری‌های ناشی از مواد غذایی دارند (Shakeri *et al.*, 2021). یک استراتژی استفاده از بسته‌بندی‌های فعال به‌منظور کاهش بار میکروبی و یا جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها بر روی مواد غذایی است. در سال‌های اخیر بسته‌بندی‌های فعال ضدمیکروبی به‌دلیل حفظ کیفیت، ایمنی غذا، و افزایش ماندگاری مورد توجه زیادی واقع شده اند (Alves *et al.*, 2020; Sezer *et al.*, 2022). در بین ضدمیکروب‌های مورد استفاده در صنعت غذا باکتریوفاژها کارآمدی بسیار خوبی جهت کنترل باکتری‌های پاتوژن دارا می‌باشند. آن ها دارای ویژگی‌هایی از جمله عمل بر روی یک پاتوژن هدف، جداسازی و تولید آسان هستند. فاژهای کوکتیل می‌توانند به‌منظور غلبه بر محدودیت طیف میزبانی فاژ مورد استفاده قرار گیرند، فاژهای تجاری مختلفی در بازار موجود هستند که

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی دوره دکتری تخصصی و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: sedaghat@um.ac.ir)
۳- محقق فلوشیپ، مؤسسه دولتی ارزیابی ریسک آلمان، برلین، آلمان

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.82253.1256

از آن جمله می‌توان به فاژ سالمونلکس ($SALMONELEX^{TM}$) اشاره کرد (Alves *et al*., 2019). سالمونلکس یک کوکتیل فاژ متشکل از دو باکتریوفاژ Felix 0-1 و S16 می‌باشد که علیه طیف وسیعی از گونه های باکتری *سالمونلا* مورد استفاده است (Yeh *et al*., 2018). پلولان یک اگزو پلی‌ساکارید است که توانایی خوبی به جهت تشکیل فیلم دارد. فیلم‌های پلولان ویژگی‌های خوبی مانند شفافیت، بی‌بویی، بی‌مزه‌گی، بی‌رنگی، حلالیت در آب، و نفوذپذیری پایین به اکسیژن و چربی دارد اما دارای قیمت بالایی است، بنابراین یک استراتژی ترکیب کردن با دیگر پلی‌مرهاست. مطالعات متعددی به جهت ترکیب پلی‌ساکاریدها با پروتئین‌ها در راستای بهبود عملکرد و کاهش هزینه‌های فیلم‌های تولیدی انجام شده است. ژلاتین یک گزینه مناسب برای ترکیب با پلولان به لحاظ خصوصیات مکانیکی خوب، کاهش نفوذپذیری، و قیمت مناسب است (Zhang *et al*., 2013). هم چنین، به‌منظور بهبود ویژگی‌های مکانیکی و مقاومت به آب افزودن نانوفیبر سلولز می‌تواند یک گزینه خوب و مناسب باشد (Roy *et al*., 2022). نانوفیبرهای سلولز می‌توانند نیروی بین مولکولی را در ترکیبات تشکیل دهنده افزایش داده و منجر به بهبود خصوصیات عملکردی فیلم‌ها شوند (Wang *et al*., 2016). مطالعات مختلفی به لحاظ استفاده از باکتریوفاژها در پوشش‌ها و فیلم‌ها به‌عنوان ترکیبات ضدباکتریایی انجام شده است، که به‌عنوان مثال می‌توان به استفاده از آن‌ها در کنسانتره پروتئین آب پنیر، کربوکسی متیل سلولز، کیتوزان، و آلژینات سدیم اشاره کرد (Sezer *et al*., 2022). هدف از انجام پژوهش حاضر، تولید فیلم فعال و زیست‌تخریب‌پذیر ژلاتین–پلولان–نانوفیبر سلولز حاوی باکتریوفاژ و ارزیابی خواص فیزیکی و ضدباکتریایی آن علیه باکتری *سالمونلا تایفی موریوم* روی گوشت مرغ در طول دوره نگهداری در دماهای ۴ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ژلاتین، گلیسرول، و تریش–بیس از شرکت سیگما آلدریچ، و پلولان از شرکت هایاشیبارای ژاپن خریداری شدند. مواد شیمیایی از قبیل زایلوز لیزین دکسیکولات[1](XLD)، تریپتون سوی براث[2] (TSB)، و آگار از شرکت اکسوید انگلیس، منیزیوم سولفات ۷ آبه ($MgSO_4.7H_2O$) از اوتووگ آلمان، و کلرید سدیم از شرکت لب کم اسپانیا، TEMPO) 2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-oxyle، ۹۸٪)، هیدروکسید سدیم (NaOH, > ۹۹٪) و هیدروکلریک اسید (۳۷٪) از شرکت سیگما آلدریچ، سدیم برمید از Hoynewell آمریکا، هیپوکلریت سدیم (NaClO) از شرکت Panreac تهیه شدند.

تیتراسیون فاژ *سالمونلا*

به‌منظور تیتر فاژ به روش آگار دولایه، ابتدا فاژ تجاری سالمونلکس (میکروئوس، هلند) در SM[3] بافر رقت‌سازی شد، سپس ۱۰۰ مایکرولیتر از محیط *سالمونلا تایفی موریوم* (ATCC 704) ۱۸ ساعت کشت، به تیوب‌های محیط TSB حاوی ۰/۴٪ اگار منتقل و بعد ۱۰۰ مایکرولیتر از هر رقت به آن‌ها اضافه و ورتکس گردیدند سپس روی محیط تریپتون سوی آگار[4] (TSA) ریخته شدند، و درنهایت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه و تعداد پلاک‌ها شمارش گردید (Yeh *et al*., 2017).

آماده‌سازی الیاف و نانوفیبر سلولز[5]

جهت تهیه نانوفیبرسلولز، فرآیند خمیرسازی سبوس برنج در یک دیگ پخت با ظرفیت ۱۵ لیتر انجام شد. دیگ پخت مجهز به یک گرم کننده خارجی، محور افقی چرخان، و سیستم‌های اندازه‌گیری دما و فشار بود که با هیدروکسید سدیم ۷٪ در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۱۵۰ دقیقه در تماس قرار گرفت. نسبت مایع پخت به وزن خشک نمونه ۸ به ۱ در نظر گرفته شد. پس از زمان مذکور، مخلوط به دست آمده از الک با مش ۰/۱۴ میلی‌متر عبور داده شد. خمیر سلولزی جهت حذف آب اضافه سانتریفیوژ و تا زمان استفاده در دمای محیط قرار گرفته تا خشک شود. از بین رفتن لیگنین موجود در فیبرها با افزودن کلریت سدیم ($NaClO_2$) در شرایط اسیدی در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان یک ساعت انجام شد، به این صورت‌که ۰/۳ گرم کلریت سدیم به ازای هر گرم فیبر با اسید استیک ۲ ٪ (حجمی:حجمی) مخلوط تا سوسپانسیون فیبری ۳ ٪ (وزنی:حجمی) به دست آید. این عمل سه مرتبه تکرار شد تا به‌طور کامل فیبرها رنگ بری شوند (Morcillo-Martín *et al*., 2022).

دو پیش تیمار مکانیکی و اکسیداسیون به وسیله TEMPO به منظور تسهیل تولید الیاف سلولز به نانو الیاف استفاده شد. در پیش تیمار مکانیکی، الیاف سلولز معلق در آب در پالایشگر پی‌اف‌آی با سرعت ۲۰۰۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفت تا به درجه روانی ۹۰ شوپر–ریگلر برسد. در اکسیداسیون به وسیله TEMPO، الیاف سلولز (۱ گرم) در آب (۱۰۰ میلی‌لیتر) حاوی 2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl radical (۰/۰۱۶ گرم، ۰/۱ میلی‌مول) و سدیم برمید (۰/۱ گرم، ۱

1- Xylose Lysine Deoxycholate
2- Tryptone Soy Broth
3- Saline Magnesium

4- Tryptone Soy Agar
5- Nanofibers Cellulose (NFCs)

میلی‌مول) قرار گرفتند، سپس محلول NaClO (۱۲٪) با pH = ۱۰ اضافه شد تا به قدرت اکسیداتیو ۵ میلی‌مول در هر گرم فیبر برسد و در دمای محیط با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه هم زده شد و اسیدیته با افزودن سود (۰/۵ مولار) در مقدار ۱۰ ثابت نگه داشته شد. در نهایت، زمانی‌که اسیدیته بدون تغییر باقی ماند واکنش به پایان رسید و سلولز اکسید شده با آب شسته و صاف شد. یک سوسپانسیون از الیاف پیش تیمار شده ۱ درصد تحت یک فرآیند نانوفیبریلاسیون در یک هموژنایزر فشار بالا قرار گرفت تا نانوالیاف تشکیل دهنده الیاف سلولزی را جدا کند. برای جلوگیری از انسداد هموژنایزر، فیبریلاسیون تدریجی به‌ترتیب زیر انجام شد: ۴ مرتبه در ۳۰۰ بار، ۳ مرتبه در ۶۰۰ بار و ۳ مرتبه در ۹۰۰ بار (Morcillo-Martín *et al*., 2022).

بازده نانوالیاف سلولز

جهت تعیین عملکرد نانوفیبرسلاسیون نانوفیبر سلولز، ژل رقیق شده (۰/۱٪ ماده خشک) به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به‌منظور جداسازی بخش غیرنانوفیبریل شده از ماده نانوفیبریل شده سانتریفیوژ شد. سپس، بخش غیرنانوفیبر جمع‌آوری و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت در آون قرار داده گرفت تا خشک شده و به وزن ثابت برسد. با توجه به رابطه (۱) بازده بخش نانوفیبریل شده محاسبه گردید (Besbes *et al*., 2010).

۱۰۰ × {[(وزن نمونه رقیق شده × مقدار ماده جامد نمونه ژل رقیق شده) / وزن بخش خشک شده} − ۱] = بازده(٪)

تهیه فیلم مرکب ژلاتین-پلولان-نانوفیبر سلولز حاوی فاژ

۱۰ گرم از هر یک از پودرهای ژلاتین و پلولان به‌صورت جداگانه به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب اضافه شدند، سپس گلیسرول ۲۰ ٪ (وزنی/وزنی) براساس وزن بیوپلیمر افزوده گردید و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد توسط گرم‌کن حرارت داده شده و به‌طور پیوسته توسط مگنت همزده شدند و با نسبت ۲۰ژلاتین–۸۰ پلولان با یکدیگر در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شدند. مقادیر ۱، ۳، و ۵٪ نانو فیبر سلولز (بازده ۹۶٪) جداگانه به فیلم مرکب حاصل اضافه شدند و مخلوط حاصل برای مدت ۳ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد همزده شدند و در نهایت محلول فاژ اضافه گردید، سپس محلول فیلم‌های تهیه شده قالب‌ریزی شدند و در دمای اتاق برای مدت ۳ روز خشک گردیدند (Miraghaei & Cheguini, 2014). فیلم‌های تهیه شده قبل از انجام آزمایشات برای مدت ۴۸ ساعت مشروط شدند. فیلم‌های بدون فاژ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

ضخامت و محتوای رطوبت فیلم‌ها

ضخامت هر یک از فیلم‌ها توسط میکرومتر دیجیتال (Mitutoyo, No, 293-561, Tokyo, Japan) در ۵ نقطه مختلف از فیلم‌ها انجام و میانگین آن‌ها در به‌عنوان ضخامت نهایی در نظر گرفته شد. به‌منظور تعیین مقدار رطوبت، فیلم‌ها به ابعاد $2 \times 2\ cm^2$ برش داده شده و وزن گردیدند (W_1) و در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند زمانی‌که به وزن ثابت رسیدند، وزن نهایی آن‌ها ثبت گردید (W_2) و درصد افت وزن نمونه‌ها با توجه به رابطه (۲) محاسبه شد (González *et al*., 2018):

(٪) مقدار رطوبت = $(W_1 - W_2 / W_1) \times 100$ (۲)

حلالیت در آب و تورم

فیلم‌ها به ابعاد $2 \times 2\ cm^2$ برش داده شده و وزن شدند (M_0) و در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و وزن آن‌ها یادداشت گردید (M_1)، سپس فیلم‌ها به‌صورت جداگانه در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار گرفتند و وزن آن‌ها بعد از قرارگیری بر روی کاغذ به‌منظور حذف آب اضافه، ثبت شد (M_2). سپس مجدد فیلم‌ها در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و در نهایت مجدد وزن گردیدند (M_3). درصد حلالیت در آب و تورم فیلم‌ها به‌ترتیب با استفاده از رابطه‌های (۳) و (۴) محاسبه گردید (Kowalczyk *et al*., 2020):

(٪) حلالیت در آب = $(M_1 - M_3 / M_1) \times 100$ (۳)

(٪) تورم = $(M_1 - M_2 / M_1) \times 100$ (۴)

خصوصیات بافتی

خصوصیات مکانیکی فیلم‌ها توسط روش استاندارد ASTM D638 و دستگاه بافت‌سنج انجام شد (ASTM, 2014). ابتدا فیلم‌ها به ابعاد $5 \times 1\ cm^2$ برش داده شدند و بین دو فک دستگاه به فاصله ۶۵ میلی‌متر و سرعت ۱۰ میلی‌متر بر دقیقه قرار گرفتند. ضخامت فیلم‌ها در قسمت‌های مختلف به‌صورت تصادفی توسط یک میکرومتر دیجیتال اندازه‌گیری شدند. آزمایشات در سه تکرار انجام شد. مقاومت کششی و کشش‌پذیری به‌ترتیب با توجه به رابطه‌های (۵) و (۶) محاسبه شدند:

مقاومت کششی (مگاپاسکال) = F_{max} / A (۵)

(٪) کشش‌پذیری = $\frac{\Delta L}{L} \times 100$ (۶)

F_{max} نشان‌دهنده حداکثر نیروی مورد نیاز برای شکست فیلم (N) و A نشان‌دهنده سطح اولیه (ضخامت × عرض، m^2). ΔL نشان‌دهنده اختلاف طول هنگام پاره شدن (mm)، و L هم نشان‌دهنده طول اولیه (mm) می‌باشند.

فاژ بارگذاری شده در فیلم‌ها

به‌منظور تعیین مقدار باکتریوفاژ بارگذاری شده در فیلم‌ها، ابتدا فیلم ها به ابعاد ۲ × ۲ cm^2 برش داده شده و داخل میکروپلیت‌های حاوی ۲ میلی‌لیتر SM بافر قرار گرفتند و توسط انکوباتور شیکردار به‌مدت یک ساعت (۱۵۰rpm) در دمای محیط قرار گرفتند. بعد از رقت‌سازی تعداد فاژها به روش آگار دو لایه تعیین شد (Kamali *et al.*, 2022a).

ناحیه بازدارندگی فیلم‌ها

به‌منظور بررسی ناحیه بازدارندگی فیلم‌ها، ابتدا باکتری *سالمونلا تایفی موریوم* (ATCC 704) در مرحله فاز لگاریتمی رشد تا رقت ۱۰^۴ (CFU. ml^{-1}) در تریپتون سوی براث رقیق شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن با محیط TSB حاوی ۰/۴ ٪ آگار مخلوط و بر روی TSB دارای ۱/۵٪ آگار ریخته شد و صبر کرده تا در دمای اتاق سفت شود. سپس، دیسک‌هایی از فیلم‌های حاوی باکتریوفاژ به قطر ۱۶ میلی‌متر بر روی آن‌ها قرار گرفت. دیسک‌های فیلم بدون باکتریوفاژ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند (Leung *et al.*, 2017).

تلقیح باکتری *سالمونلا* به گوشت مرغ

گوشت مرغ از فروشگاه مواد غذایی تهیه و در ظرف حاوی کیسه یخ به سرعت به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌های گوشت مورد آزمایش میکروبی تشخیص *سالمونلا* قرار گرفتند تا به لحاظ عدم حضور باکتری پاتوژن *سالمونلا* بررسی شوند. نتایج نشان داد که گوشت مورد آزمایش عاری از باکتری *سالمونلا* است. گوشت‌ها در زیر هود لامینار در شرایط استریل به قطعاتی با وزن ۵ گرم برش داده شدند، سپس از سوسپانسیون باکتری که دارای غلظت ($CFU. ml^{-1}$) 10^8 بود تا غلظت ($CFU. ml^{-1}$) 10^5 رقت‌سازی انجام و مقدار ۵۰ میکرولیتر از آن به سطح گوشت مرغ تلقیح شد و در نهایت غلظت ($CFU. g^{-1}$) 10^4 به دست آید. بعد از ۲۰ دقیقه فیلم حاوی فاژ بر سطح گوشت قرار گرفت. نمونه‌های آماده شده در دماهای ۴ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و بعد از ۳۰ دقیقه، ۱، ۳، ۷، و ۹ روز تعداد باکتری‌های پاتوژن و تعداد فاژهای موجود بر سطح گوشت مورد بررسی قرار گرفتند. فیلم بدون فاژ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد (Weng *et al.*, 2021).

شمارش باکتری *سالمونلا تایفی موریوم*

نمونه‌های گوشت مرغ مورد آزمایش در شرایط استریل داخل کیسه قرار گرفته و توسط ترازوی رقیق‌کننده حجم مناسبی از SM بافر با نسبت ۱ به ۱۰ رقیق‌سازی انجام شد و توسط بلندر مخلوط شدند. سپس جهت شمارش باکتری پاتوژن در محلول کلرید سدیم (۰/۰۸۵ ٪) رقت سازی انجام و بر روی محیط XLD آگار کشت خطی داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند، و در نهایت تعداد باکتری‌ها شمارش گردید (Radford *et al.*, 2017).

شمارش فاژهای سطح گوشت

جهت شمارش فاژهای موجود در سطح گوشت‌های مرغ، از کیسه های حاوی نمونه گوشت و محلول SM بافر حجمی از بخش مایع برداشته و توسط فیلتر سیرینگ (۰/۲۲ مایکرومتر) مخلوط باکتری و فاژ از یکدیگر جدا گردیدند و از بخش مایع فیلتر شده رقت‌سازی در SM بافر انجام و به روش آگار دولایه تعداد فاژها تعیین گردید (Radford *et al.*, 2017).

طرح آماری

آزمایشات براساس طرح فاکتوریل در قالب کاملا تصادفی انجام شدند، و داده‌ها براساس روش تجزیه آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح آماری ۵ درصد انجام شد. آزمایشات در سه تکرار انجام گرفتند.

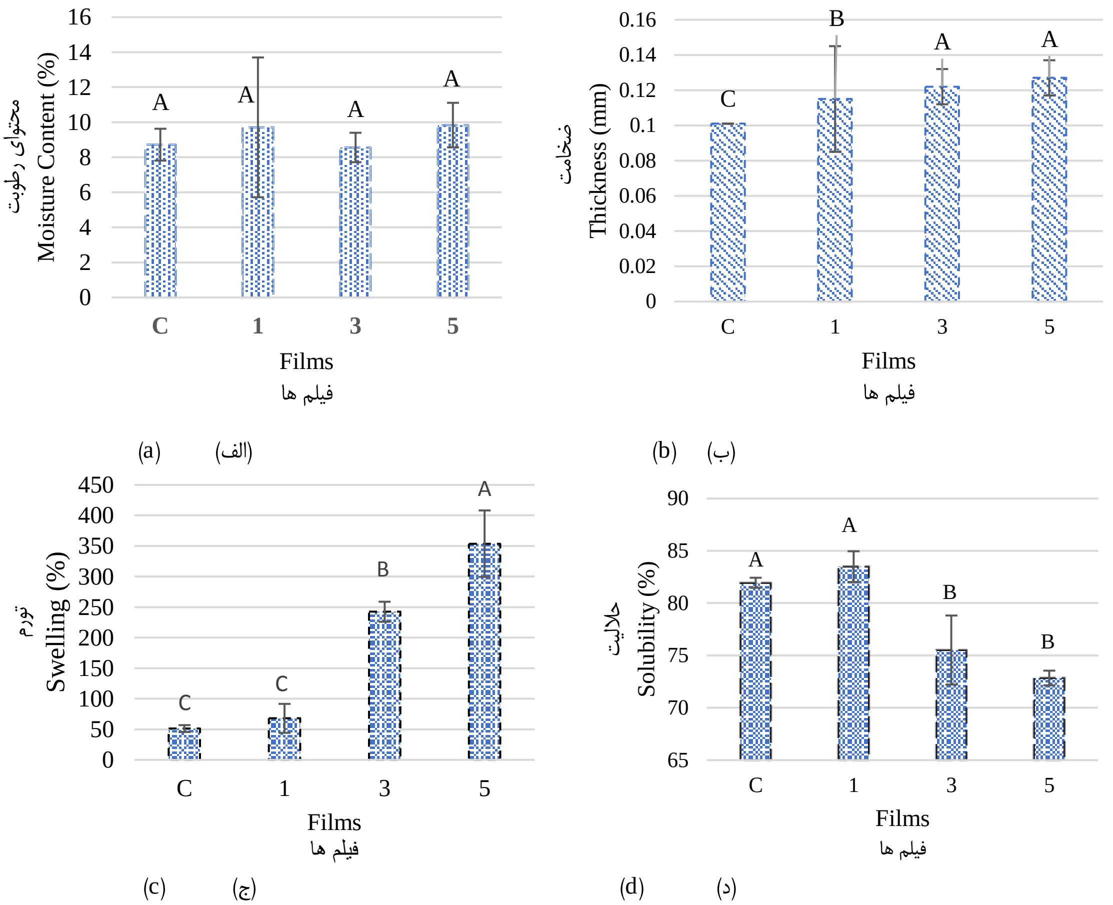
نتایج و بحث

ضخامت، محتوای رطوبت، حلالیت، و تورم فیلم ها

همان‌طور که در شکل ۱ (الف) مشاهده می‌کنید، فیلم ۲۰ ژلاتین-۸۰ پلولان (شاهد) کم‌ترین ضخامت را داشت و استفاده از ۳ و ۵ ٪ نانوفیبر سلولز در آن ضخامت بیشتری را در مقایسه با فیلم حاوی ۱٪ نانوفیبر سلولز ایجاد کرد ($P<0.05$) که دلیل این افزایش ضخامت مربوط به افزایش مقدار مواد جامد است (Kassab *et al.*, 2019). محتوای رطوبت فیلم ژلاتین-پلولان حاوی مقادیر مختلف نانوالیاف سلولز در شکل ۱ (ب) نشان داده شده است. افزودن نانوالیاف سلولز تفاوت معناداری در محتوای رطوبت فیلم‌ها نداشت ($P>0.05$). در یک مطالعه، نتایج نشان داد که افزودن نانوبلور سلولز به فیلم ژلاتین منجر به افزایش ضخامت شد و این افزایش ضخامت با افزایش درصد نانوکریستال‌ها رابطه مستقیمی داشت (Ratna *et al.*, 2022). هم چنین، آن‌ها نشان دادند که افزودن مقادیر مختلف نانوالیاف سلولز به فیلم ژلاتین، محتوای رطوبت فیلم‌ها را تحت تأثیر قرار نداد.

شکل ۱ اثر افزودن درصدهای مختلف نانوالیاف سلولز را بر حلالیت (ج) و تورم (د) فیلم ژلاتین-پلولان نشان می‌دهد. افزودن مقادیر مختلف نانوالیاف سلولز به فیلم ژلاتین-پلولان تفاوت آماری معناداری را در حلالیت و تورم فیلم‌ها نشان داد ($P<0.05$). بالاترین میزان حلالیت مربوط به فیلم شاهد و فیلم حاوی ۱٪ نانوفیبر بود و با افزودن

۳٪ و ۵٪ نانوفیبر به فیلم شاهد حلالیت کاهش قابل ملاحظه‌ای پیدا کرد که یکی از دلایل آن مربوط به تفاوت در ضخامت فیلم‌ها است زیرا فیلم‌های خوراکی با ضخامت کم‌تر، حلالیت بیشتری را از خود نشان می‌دهند (Khodaei *et al*., 2020). دلیل دیگر مربوط به ساختار سه بعدی نانوفیبر سلولز است که از حرکت و جابه جایی پلیمر به آب محافظت می‌کند. به‌علاوه، با ورود نانوفیبر سلولز به فیلم خاصیت کریستالی افزایش می‌یابد که منجر به کاهش نفوذ آب به درون زنجیره های پلیمر می‌شود (Jahed *et al*., 2019). افزودن نانوفیبر اتیل سلولز به فیلم پلولان منجر به افزایش پایداری در آب شد و با افزایش مقدار نانوفیبر در فیلم پلولان، پایداری در آب بیشتر شد (Yang *et al*., 2020). همان‌طور که در شکل ۱ (د) مشاهده می‌کنید، بیشترین و کم ترین تورم را به ترتیب فیلم‌های دارای ۵٪ نانوفیبر سلولز و فیلم شاهد نشان دادند. افزودن نانوفیبر تورم را افزایش داد زیرا استفاده از نانوفیبر سلولز تخلخل را در ساختار فیلم افزایش می‌دهد. در یک مطالعه، افزودن نانوفیبرهای سلولز باکتریایی به فیلم ژلاتین ماهی منجر به کاهش شاخص تورم در فیلم‌ها شد (Shabanpour *et al*., 2018).



شکل ۱- ضخامت (الف)، محتوای رطوبت (ب)، حلالیت (ج)، و تورم (د) فیلم های ژلاتین-پلولان حاوی درصدهای مختلف نانوفیبر سلولز

Fig. 1. Thickness (a), moisture content (b), solubility (c), and swelling (d) of gelatin-pullulan films containing at different percentages of NFCs

خصوصیات مکانیکی

جدول ۱ اثر درصدهای مختلف نانوفیبر را بر مقاومت کششی و کشش‌پذیری فیلم مرکب ژلاتین-پلولان نشان می‌دهد. افزودن نانوفیبر به فیلم مرکب ژلاتین-پلولان منجر به تغییر معناداری در مقاومت کششی و درصد کشش پذیری شد ($P<0.05$)، به‌طوری‌که مقدار مقاومت کششی در فیلم ژلاتین-پلولان حاوی ۵، ۳، ۱٪ نانوفیبر، و شاهد به‌ترتیب ۳۲/۳، ۲۷/۹۶، ۲۶/۲۷، و ۲۲/۱۷ مگاپاسکال بود. فیلم دارای ۵٪ نانوفیبر استحکام کششی بالاتری نسبت به فیلم شاهد داشت که به بر هم‌کنش‌های سطحی مناسب بین ماتریس پلیمر و نانوفیبر سلولز می‌تواند مربوط باشد، که منجر به انتقال کارآمد تنش توسط لایه های نانوفیبر-پلیمر می شود. فیلم‌های دارای نانوالیاف سلولز دارای درصد کشش‌پذیری پایین‌تری نسبت به فیلم شاهد بودند، که دلیل آن

را می‌توان به افزایش ضخامت در فیلم‌ها مربوط دانست (Roy & Rhim, 2022)، و یا ایجاد باندهای هیدروژنی درون مولکولی بین گروه های ژلاتین-پلولان و نانوفیبر سبب افزایش مقاومت به کشش و کاهش کشش‌پذیری شده‌اند (Chen & Chi, 2022). ترووواتی و همکاران (Trovatti *et al.*, 2012) نشان دادند که افزودن نانوفیبر به فیلم پلولان منجر به افزایش مقاومت کششی و کاهش کشش‌پذیری شد.

جدول ۱- تأثیر مقادیر مختلف نانوفیبر سلولز بر مقاومت کششی و کشش‌پذیری فیلم ژلاتین-پلولان

Table 1- The effect of cellulose nanofibers on tensile strength and elongation of gelatin-pullulan film

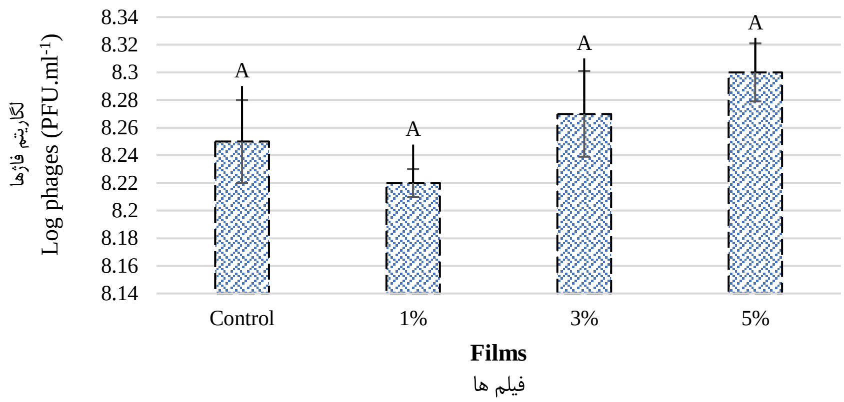
فیلم‌ها Films	مقاومت کششی Tensile strength (MPa)	کشش‌پذیری Elongation (%)
Control	22.173 ± 6.39^{C}	5.50 ± 3.54^{A}
1%	26.27 ± 1.94^{B}	3.03 ± 0.59^{B}
3%	27.958 ± 3.25^{B}	3.36 ± 0.07^{B}
5%	32.3 ± 5.14^{A}	3.34 ± 0.78^{B}

* داده‌ها براساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. داده‌های دارای حروف مشابه در یک ستون از لحاظ آماری اختلاف معنادار ندارند (P<0.05).

*Results are reported as mean ± SD. Mean with different letters in each column present significant difference (P<0.05).

فاژ بارگذاری شده در فیلم‌ها

همان‌طور که در شکل ۲ ملاحظه می کنید، تفاوت آماری معناداری بین مقدار فاژ بارگذاری شده در فیلم‌های ژلاتین-پلولان حاوی مقادیر مختلف نانوفیبر سلولز وجود ندارد (P>0.05). مطالعات گووآ و همکاران (Gouvea *et al.*, 2015) نشان داد که فیلم استات سلولز حاوی باکتریوفاژ اثری در از بین رفتن فاژها در طی فرآوری و خشک کردن نداشت. درحالی‌که، نتایج آزمایشات فرجی و همکاران (Faraji *et al.*, 2019) نشان داد که تولید فیلم استات سلولز حاوی فاژ بدون تیمار پلاسما، تعداد فاژ بارگذاری شده در فیلم کاهش یافت که این تفاوت مربوط به روش افزودن فاژ به فیلم و نوع فاژ به کار رفته است.



شکل ۲- فاژ بارگذاری شده در فیلم ژلاتین-پلولان حاوی مقادیر مختلف نانوفیبر سلولز

Fig. 2. Loaded phages in gelatin-pullulan film containing at different percentages of NFCs

ناحیه بازدارندگی

جدول ۲ ناحیه بازدارندگی فیلم ژلاتین-پلولان حاوی درصدهای مختلف ۱، ۳، و ۵ ٪ نانوفیبر سلولز را در برابر باکتری *سالمونلا تایفی موریوم* نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌کنید، تفاوت معناداری بین ناحیه بازدارندگی فیلم‌ها دیده نمی‌شود (P>0.05)، و در فیلم‌های فاقد فاژ (شاهد) ناحیه بازدارندگی صفر بود. مکانیسم عمل آن به‌صورت خلاصه این چنین است که فاژ Felix 0-1 می‌تواند باندهایی با گیرنده های N-استیل گلوگزآمین‌های قرار گرفته در ترمینال زنجیره‌های پلی ساکاریدی تشکیل دهد، که روی مرکز سطح خارجی لیپو پلی‌ساکارید است و فاژ S16 باندهایی با غشاء خارجی پروتئین C تشکیل می‌دهد، که در نهایت منجر به لیز شدن و مرگ سلول باکتری می‌شود. N – استیل گلوگز آمین و پروتئین C ترکیبات متداول باقی‌مانده روی سطح غشاء باکتری *سالمونلا* هستند (Yeh *et al.*, 2017).

جدول ۲- ناحیه بازدارندگی فیلم ژلاتین-پلولان دارای درصدهای مختلف نانوفیبر سلولز در برابر باکتری *سالمونلا تایفی موریوم*

Table 2- Zone inhibitory of gelatin-pullulan film at different percentages of NFCs loaded with phages against *S. typhimurium* bacteria

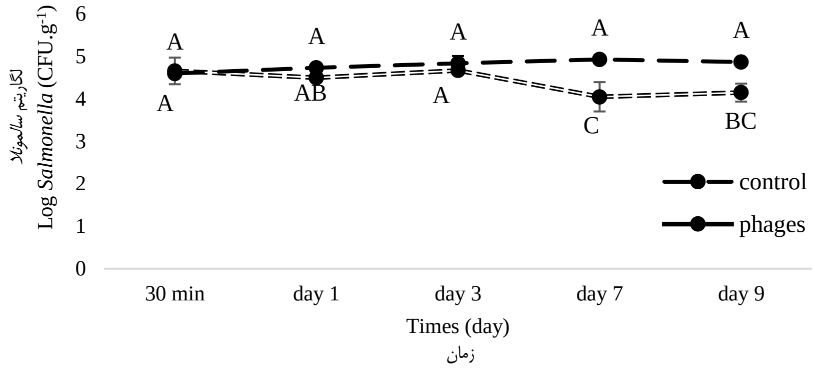
فیلم‌ها Films	ناحیه بازدارندگی Zone inhibitory (cm)
Control+Phage	2.17 ± 0.136^{A}
Control	0^{B}
Control +1%+Phage	2.01 ± 0.369^{A}
Control +1%	0^{B}
Control +3%+Phage	2.23 ± 0.118^{A}
Control +3%	0^{B}
Control +5%+Phage	2.12 ± 0.354^{A}
Control +5%	0^{B}

* داده‌ها براساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. داده‌های دارای حروف مشابه در یک ستون از لحاظ آماری اختلاف معنادار ندارند (P<0.05).

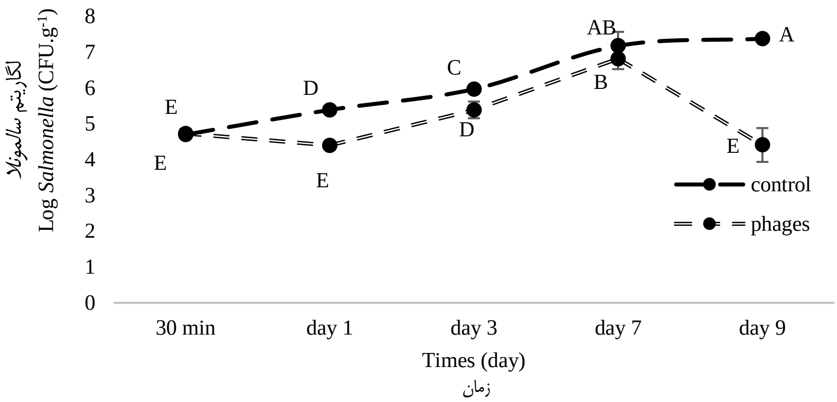
*Results are reported as mean ± SD. Mean with different letters in each column present significant difference (P<0.05).

شمارش باکتری پاتوژن

فیلم مرکب ژلاتین—پلولان دارای ۵٪ نانوفیبر سلولز به‌دلیل داشتن خصوصیات فیزیکوشیمیایی مناسب‌تری جهت استفاده روی گوشت مرغ تلقیح شده به باکتری *سالمونلا* انتخاب شد. شکل‌های ۳ (الف) و (ب) اثر ضدباکتریایی فیلم‌های حاوی و فاقد فاژ را در طول دوره نگه‌داری در دو دمای ۴ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهند. همان‌طور که مشاهده می‌کنید، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فیلم ضدباکتریایی در روزهای اول و سوم تفاوت معناداری در مقایسه با شاهد نداشت (P>0.05)، در حالی‌که در روزهای هفتم و نهم نزدیک به یک و ۰/۷ سیکل لگاریتمی کاهش در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده شد (P<0.05)، در حالی‌که در دمای ۱۲ درجه (شکل ۳ ب) فیلم حاوی فاژ بعد از یک روز ۱ سیکل لگاریتمی و در روز نهم ۲/۳۵ سیکل لگاریتمی کاهش در مقایسه با شاهد داشت (P<0.05). دمای بهینه برای فاژها ۳۰ درجه سانتی‌گراد است بنابراین فاژ در دمای بالاتر نسبت به دمای پایین بهتر عمل می‌کند (Dicastillo *et al*., 2021). هم‌چنین، توزیع یکنواخت و توانایی انتشار کارآمد ذرات فاژ، ساختار و ترکیبات شیمیایی غذاهای مختلف بر خاصیت ضدمیکروبی فاژ تأثیر دارند (Guenther *et al*., 2012). نتایج رادفورد و همکاران (Radford *et al*., 2017) نشان داد که اثر ضدباکتریایی فیلم دولایه پلی لاکتیک اسید/ زانتان در دمای ۱۰ درجه نسبت به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در برابر باکتری‌های پاتوژن *سالمونلا* و *لیستریا* با یکدیگر تفاوت داشته و در دمای بالاتر تعداد باکتری‌های پاتوژن کاهش بیشتری را داشتند. جمعیت باکتری *سالمونلا* در نمونه‌های تیمار شده با فیلم حاوی فاژ *سالمونلا* در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در روز سوم کاهش معناداری در مقایسه با نمونه های شاهد در شرایط هوازی و خلاء بسته‌بندی داشت و حتی در شرایط خلاء در روز ۱۴ کاهش بیشتری مشاهده شد و کاهش جمعیت بیشتری در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۴ درجه با گذشت زمان نشان داد. نتایج ونگ و همکاران (Weng *et al*., 2021) نشان داد که استفاده از فیلم ژلاتین حاوی فاژ استافیلوکوکوس روی نمونه‌های پنیر نگه‌داری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در روز سوم منجر به کاهش قابل توجهی در جمعیت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* شد که با افزایش میزان فاژ بارگذاری شده در فیلم تعداد باکتری کاهش بیشتری داشت (Weng *et al*., 2021). کمالی و همکاران (Kamali *et al*., 2022b) گزارش کردند استفاده از فیلم دو لایه پلی‌لاکتیک اسید/کنسانتره پروتئین آب پنیر حاوی فاژ *لیستریا* روی گوشت مرغ در دماهای ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد بعد از ۲۴ ساعت کاهش معناداری را در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد و اثر ضدباکتریایی در روز پنجم به حداکثر رسید و بعد از آن تفاوت معناداری نداشت، به‌علاوه، اثر ضدباکتریایی فیلم فعال علیه باکتری *لیستریا* در دمای ۴ درجه نسبت به ۱۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر بود (Kamali *et al*., 2022b). در یک مطالعه، گوشت گاو تلقیح شده به باکتری پاتوژن *سالمونلا* توسط باکتریوفاژ سالمونلکس تیمار شد و نتیجه آزمایش بعد از ۲۴ ساعت ۱/۲۹ سیکل لگاریتمی کاهش را در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد (Yeh *et al*., 2017).



(a) **(الف)**



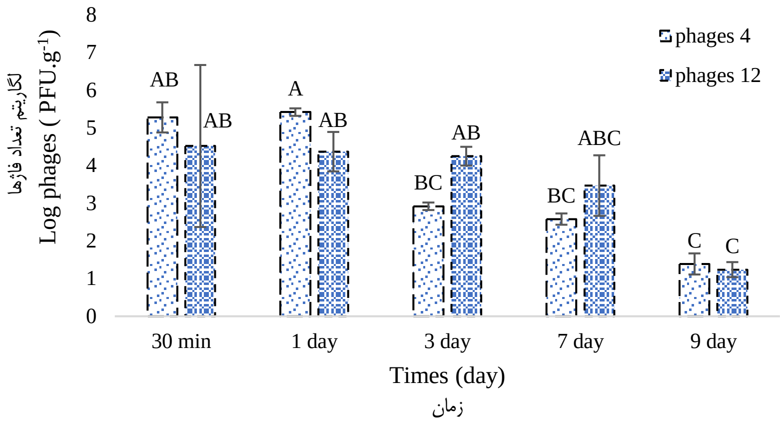
(b) **(ب)**

شکل ۳- تعداد باکتری *سالمونلا تایفی موریوم* بر روی گوشت مرغ در دماهای ٤(الف) و ١٢(ب) درجه سانتی‌گراد در طی زمان

Fig. 3. Numbers of *S. typhimurium* bacteria on the chicken meat at 4 ℃ (a) and 12 ℃ (b) temperatures during times

شمارش فاژهای سطح گوشت

شکل ۴ تعداد فاژهای موجود در بر سطح گوشت مرغ را در دو دمای ۴ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌کنید، به‌طور کلی با گذشت زمان تعداد فاژها کاهش می‌یابد. تعداد فاژهای موجود بر سطح نمونه‌های گوشت مرغ در دو دما با یکدیگر تفاوت آماری معناداری نداشتند ($P>0.05$). به‌طور کلی، پایداری فاژها به ماتریس غذایی که به‌عنوان بستر (سوبسترا) استفاده شده بستگی دارد (Robeson *et al.*, 2014). ترکیبات موجود در غذا و فاژ استفاده شده بر پایداری فاژ در سیستم‌های غذایی اثرگذار هستند و هرگونه تغییر می تواند نقطه ایزوالکتریک فاژ و مقاومت یونی محیط را تغییر دهد و منجر به تغییر ساختار و عملکرد فاژ شود (C.García-Anaya *et al.*, 2020). نتایج یک مطالعه نشان داد که استفاده از فیلم دو لایه پلی لاکتیک اسید/زانتان حاوی باکتریوفاژهای *سالمونلا* و *لیستریا* در طی دوره نگه‌داری در دو دمای ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد با یکدیگر تفاوت آماری معناداری ندارند (Radford *et al.*, 2017). نتایج یک مطالعه دیگر نشان داد که رهایش فاژها از فیلم با نسبت ۳۰ پلی‌لاکتیک اسید/ ۷۰ پروتئین آب پنیر به سطح گوشت بعد از یک ساعت ۶۳/۲۲ ٪ و ۶۳/۱۸ ٪ به‌ترتیب در دماهای ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد بودند که با یکدیگر تفاوت معناداری نداشتند و در طی دوره ۵ روزه بعد از یک روز در هر دو دما تعداد فاژهای موجود بر سطح گوشت ثابت بود (Kamali *et al.*, 2022b). در مطالعه دیگر، درصد رهایش فاژهای انکپسوله شده در فیلم ایزوله پروتئین آب پنیر به سطح کاهو بعد از ۳ ساعت ۰/۳۷ ٪ بود. دلیل این تفاوت‌ها را می‌توان به ویژگی‌های فاژهای مختلف و پوشش‌ها مربوط دانست (Vonasek *et al.*, 2014).



شکل ٤- تعداد فاژهای *سالمونلا* بر روی گوشت مرغ در دماهای ٤ و ١٢ درجه سانتی‌گراد در طی زمان

Fig. 4. Numbers of *Salmonella* phages at 4 ℃ and 12 ℃ temperatures on the chicken meat during times

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که فیلم مرکب ژلاتین-پلولان-نانوفیبر سلولز می‌تواند به‌عنوان یک سیستم حامل باکتریوفاژ روی ماده غذایی می‌تواند کاربرد داشته باشد. اثر آنتی‌باکتریال فیلم‌های ژلاتین-پلولان دارای مقادیر مختلف نانوفیبر سلولز حاوی باکتریوفاژ روی محیط آگار با یکدیگر تفاوت معناداری نداشتند. رهایش باکتریوفاژها از فیلم مرکب به سطح گوشت مرغ منجر به کاهش جمعیت باکتری *سالمونلا* شد. اثر آنتی‌باکتریال فیلم ترکیبی ژلاتین-پلولان-نانوفیبر سلولز روی گوشت مرغ علیه باکتری پاتوژن *سالمونلا* در دمای ۱۲ درجه موفقیت آمیزتر از دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود و در دمای ۴ ℃ کاهش آهسته تری را در جمعیت *سالمونلا* شاهد بودیم، زیرا حداقل دمای رشد برای باکتری *سالمونلا* ۱۰ درجه سانتی‌گراد است تا باکتریوفاژ بتواند اثر آنتی باکتریال خود را بهتر نشان دهد. پیشنهاد ما این است که استفاده از این فیلم ضدباکتریایی در میوه‌ها و سبزیجات که در دمای بالاتری نسبت به گوشت نگه‌داری می‌شوند، مناسب‌تر است و اثربخشی بیشتری دارد، لذا بایستی مورد مطالعه بیشتر قرار گیرد.

سپاسگزاری

این پژوهش با کد ۳/۵۲۶۱۴ با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد و دانشگاه کوردوبای اسپانیا انجام شده است، بدین‌وسیله از حمایت آنان تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Alves, D., Cerqueira, M.A., Pastrana, L.M., & Sillankorva, S. (2020). Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. *Food Research International*, *128*, 108791. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108791
2. Alves, D., Marques, A., Milho, C., Costa, M.J., Pastrana, L.M., Cerqueira, M.A., & Sillankorva, S.M. (2019). Bacteriophage ϕIBB-PF7A loaded on sodium alginate-based films to prevent microbial meat spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, *291*(16), 121-127. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.026
3. ASTM. (2014). Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics. In *ASTM International* (Vol. ASTM D638-14, pp. 1–15). West Conshohocken: PA, USA.
4. Besbes, I., Alila, S., & Boufi, S. (2010). Nanofibrillated cellulose from TEMPO-oxidized eucalyptus fibres: Effect of the carboxyl content. *Carbohydrate Polymers*, *84*(3), 975–983. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.052
5. Chen, F., & Chi, C. (2022). Development of pullulan/carboxylated cellulose nanocrystal/tea polyphenol bionanocomposite films for active food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, *186*(1), 405–413. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.025
6. C.García-Anaya, M., R.Sepúlveda, D., ClaudioRios-Velasco, B.Zamudio-Flores, P., I.Sáenz-Mendoza, A., & H.Acosta-Muñiz, C. (2020). The role of food compounds and emerging technologies on phage stability. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *64*, 102436. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102436
7. Dicastillo, C.L., Settier-Ramírez, L., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P., & Carballo, G.L. (2021). Development of biodegradable films loaded with phages withantilisterial properties. *Polymers*, *13*(3), 327. https://doi.org/10.3390/polym13030327

8. Faraji, S., Maghsoudlou, Y., Khomeiri, M., Kashiri, M., & Babaei, A. (2019). In vitro biocontrol of *Escherichia coli* through the immobilization of its specific lytic bacteriophage on cellulose acetate biodegradable film. *Iranian Journal of Medical Microbiology, 12*(6), 399-408. https://doi.org/10.30699/ijmm.12.6.399
9. González, A., Gastelú, G., Barrera, G.N., Ribotta, P.D., & Igarzabal, C.I.Á. (2018). Preparation and characterization of soy protein films reinforced with cellulose nanofibers obtained from soybean by-products. *Food Hydrocolloids, 89*, 758-764. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.051
10. Gouvea, D.M., Mendonça, R.C.S., Soto, M.L., & Cruz, R.S. (2015). Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. *LWT - Food Science and Technology, 63*(1), 85-91. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.014
11. Guenther, S., Herzig, O., Fieseler, L., Klumpp, J., & Loessner, M.J. (2012). Biocontrol of *Salmonella typhimurium* in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *International Journal of Food Microbiology, 154*(1-2), 66-77. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.023
12. Jahed, E., Almasi, H., & Khaledabad, M.A. (2019). Producing and optimizing the properties of chitosan-organic nanofiber biodegradable nanocomposite based containing *O. vulgare* subsp. *gracile* and *C. copticum* essential oils and its application on the oxidative stability of Canola oil. *Iranian Food Science and Technology, 14*(5), 907-927. https://doi.org/10.22067/ifstrj.v14i5.71229
13. Kamali, S., Yavarmanesh, M., Najafi, M.B.H., & Koocheki, A. (2022a). Development of whey protein concentrate/pullulan composite films containing bacteriophage A511: Functional properties and anti-Listerial effects during storage. *Food Packaging and ShelfLife, 33*, 100902-100917. https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100902
14. Kamali, S., Yavarmanesh, M., Najafi, M.B.H., & Koocheki, A. (2022b). Poly (lactic acid) and whey protein/pullulan composite bilayer film containing phage A511 as an anti-Listerial packaging for chicken breast at refrigerated temperatures. *LWT- Food Science and Technology, 170*, 114085. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114085
15. Kassab, Z., Aziz, F., Hannache, H., Youcef, H.B., & Achaby, M.E. (2019). Improved mechanical properties of k-carrageenan-based nanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals. *International Journal of Biological Macromolecules, 123*, 1248-1256. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.030
16. Khodaei, D., Oltroggea, K., & Hamidi-Esfahani, Z. (2020). Preparation and characterization of blended edible films manufactured using gelatin, tragacanth gum and, Persian gum. *LWT- Food Science and Technology, 117*, 108617. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108617
17. Kowalczyk, D., MonikaKordowska-Wiater, Karas, M., Zięba, E., MonikaMężyńska, & Wiącek, A.E. (2020). Release kinetics and antimicrobial properties of the potassium sorbate-loaded edible films made from pullulan, gelatin and their blends. *Food Hydrocolloids, 101*, 105539. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105539
18. Leung, V., Szewczyk, A.Y., Chau, J., Hosseini-Doust, Z., Groves, L., Hawsawi, H., Filipe, C.D.M. (2017). Long-term preservation of bacteriophage antimicrobials using sugar glasses. *ACS Biomaterials Science and Engineering, 4*(11), 3802-3808. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00468
19. Miraghaei, S., & Cheguini, F.K. (2014). Paper presented at the International Conference on Natural Food Hydrocolloids, Mashhad.
20. Morcillo-Martín, R., Espinosa, E., Rabasco-Vílchez, L., Sanchez, L.M., Haro, J.., & Rodríguez, A. (2022). Cellulose nanofiber-based aerogels from wheat straw: influence of surface load and lignin content on their properties and dye removal capacity. *Biomolecules, 12*(2), 32. https://doi.org/10.3390/biom12020232
21. Radford, D., Guild, B., Strange, P., Ahmed, R., Lim, L.-T., & Balamurugan, S. (2017). Characterization of antimicrobial properties of *Salmonella* phage Felix O1 and *Listeria* phage A511 embedded in xanthan coatings on Poly (lactic acid) films. *Food Microbiology, 66*, 117-128. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.015
22. Ratna, Aprilia, S., Arahman, N., Bilad, M.R., Suhaimi, H., Munawar, A.A., & Nasution, I.S. (2022). Bio-nanocomposite based on edible gelatin film as active packaging from *Clarias gariepinus* fish skin with the addition of cellulose nanocrystalline and nanopropolis. *Polymers, 14(18)*, 3738. https://doi.org/10.3390/polym14183738
23. Robeson, J., Turra, G., Huber, K., & Borie, C. (2014). A note on stability in food matrices of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis-controlling bacteriophages. *Electronic Journal of Biotechnology, 17*(4), 189-191. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.06.001
24. Roy, S., Biswas, D., & Rhim, J.-W. (2022). Gelatin/cellulose nanofiber-based functional nanocomposite film incorporated with zinc oxide nanoparticles. *Journal Composites Science, 6*(8), 223. https://doi.org/10.3390/jcs6080223
25. Roy, S., & Rhim, J.W. (2022). Gelatin/cellulose nanofber‑based functional flms added with mushroom‑mediated sulfur nanoparticles for active packaging applications. *Journal of Nanostructure in Chemistry, 12*, 979–990. https://doi.org/10.1007/s40097-022-00484-3
26. Sezer, B., Tayyarcan, E.K., & Boyaci, I.H. (2022). The use of bacteriophage-based edible coatings for the biocontrol of *Salmonella* in strawberries. *Food Control, 135*(101812). https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108812

27. Shabanpour, B., Kazemi, M., Ojagh, S.M., & Pourashouri, P. (2018). Bacterial cellulose nanofibers as reinforce in edible fish myofibrillar protein nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, *117*(1), 742-751. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.038
28. Shakeri, G., Hammerl, J.A., Jamshidi, A., Ghazvini, K., Rohde, M., Szabo, I., & Kittler, S. (2021). The lytic siphophage vB_StyS-LmqsSP1 reduces the number of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates on chicken skin. *Appllied and Environmental Microbiology*, *87*(24), e01424-01421. https://doi.org/10.1128/AEM.01424-21
29. Trovatti, E., Fernandes, S.C.M., Rubatat, L., Perez, D.S., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., & Neto, C.P. (2012). Pullulan–nanofibrillated cellulose composite films with improved thermal and mechanical properties. *Composites Science and Technology*, *72*(13), 1556–1561. https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2012.06.003
30. Vonasek, E., Le, P., & Nitin, N. (2014). Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release. *Food Hydrocolloids*, *37*, 7-13. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.017
31. Wang, W., Liu, Y., Jia, H., Liu, Y., Zhang, H., He, Z., & Ni1, Y. (2017). Effects of cellulose nanofibers filling and palmitic acid emulsions coating on the physical properties of fish gelatin films. *Food Biophysics*, *12*, 23-32. https://doi.org/10.1007/s11483-016-9459-y
32. Weng, S., Lopez, A., Saez-Orviz, S., Marcet, I., García, P., Rendueles, M., & Díaz, M. (2021). Effectiveness of bacteriophages incorporated in gelatine films against *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, *121*, 1-10. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107666
33. Yeh, Y., Moura, F.H.., Broek, K.V.D., & Mello, A.S. (2018). Effect of ultraviolet light, organic acids, and bacteriophage on *Salmonella populations* in ground beef. *Meat Science*, *139*, 44-48. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.01.007
34. Yang, Y., Xie, B., Liu, Q., Kong, B., & Wang, H. (2020). Fabrication and characterization of a novel polysaccharide based composite nanofiber films with tunable physical properties. *Carbohydrate Polymers*, *236*(15), 116054. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116054
35. Yeh, Y., Purushothaman, P., Gupta, N., Ragnone, M., Verma, S.C., & Mello, A.S. (2017). Bacteriophage application on red meats and poultry: Effects on *Salmonella* population in final ground products. *Meat Science*, *127*, 30-34. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.01.001
36. Zhang, C., Gao, D., Ma, Y., & Zhao, A.X. (2013). Effect of gelatin addition on properties of pullulan films. *Journal of Food Science*, *78*(6), C805-C810. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02925.x